

研究报告

柑橘废弃物堆肥中高效木质素降解菌的筛选及其降解效果

李金业, 程昊, 徐青云, 刘小曼, 武松伟, 胡承孝*

华中农业大学 资源与环境学院, 湖北 武汉 430070

李金业, 程昊, 徐青云, 刘小曼, 武松伟, 胡承孝. 柑橘废弃物堆肥中高效木质素降解菌的筛选及其降解效果[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 230-248.

LI Jinye, CHENG Hao, XU Qingyun, LIU Xiaoman, WU Songwei, HU Chengxiao. Screening of efficient lignin-degrading bacteria in citrus waste compost[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 230-248.

摘要: 【背景】柑橘修剪枝是一种丰富可再生的生物质资源, 但枝条中木质纤维素结构稳定且复杂, 限制了其资源化利用。【目的】从柑橘废弃物堆肥中筛选和鉴定高效木质素降解菌, 优化菌株降解木质素的条件, 为柑橘枝类废弃物的资源化利用提供菌种资源。【方法】以苯胺蓝褪色法筛选菌株, 对比不同菌株的漆酶、锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶酶活, 通过单因素试验、正交试验和响应面试验优化目的菌株 LDB1 的木质素降解条件, 利用室内试验验证菌株 LDB1 对 3 种植物源木质素的降解效果。【结果】从柑橘枝废弃物堆肥中筛选出 8 株木质素降解细菌, 其中菌株 LDB1 产酶能力最强, 该菌被鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。pH、接种量和 C/N 是影响菌株 LDB1 降解木质素的显著影响因子, 当三者分别为 6.9、2.9%和 29.0 时, 木质素降解率最大, 4 d 后达到(14.9±0.9)%, 较正交试验结果提升 2.0%。经菌株 LDB1 降解 30 d 后, 柑橘枝、玉米秸秆和水稻秸秆的木质素降解率分别为 12.0%、36.8%和 30.6%。【结论】本研究筛选的解淀粉芽孢杆菌 LDB1 能同时分泌 3 种木质素降解酶, 能够有效破坏木质纤维素结构, 具备较强的木质纤维素降解能力。

关键词: 柑橘废弃物; 木质素降解; 酶活; 解淀粉芽孢杆菌; 条件优化

资助项目: 云南省重大科技专项计划(202102AE090054); 国家现代农业(柑橘)产业技术体系(CARS-26)

This work was supported by the Major Science and Technology Special Plan of Yunnan Province (202102AE090054) and the Modern Citrus Industry Technology System of China (CARS-26).

*Corresponding author. E-mail: hucx@mail.hzau.edu.cn

Received: 2024-04-25; Accepted: 2024-05-12; Published online: 2024-05-30

Screening of efficient lignin-degrading bacteria in citrus waste compost

LI Jinye, CHENG Hao, XU Qingyun, LIU Xiaoman, WU Songwei, HU Chengxiao*

College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: **[Background]** Pruned branches of citrus are rich and renewable biomass resources, in which the stable and complex lignocellulose structure limits the utilization of the resources. **[Objective]** To screening and identify efficient lignin-degrading bacteria from citrus waste compost and optimize the lignin-degrading conditions of strains, thus providing strain resources for the utilization of citrus waste. **[Methods]** We isolated lignin-degrading strains from citrus waste compost by the aniline blue method and compared the laccase, manganese peroxidase, and lignin peroxidase activities between different strains. Then, we optimized the lignin degradation conditions of the target strain (LDB1) by single factor tests, orthogonal test, and response surface methodology. Finally, we verified the degradation effect of LDB1 on the lignin derived from three plant species by laboratory experiments. **[Results]** We isolated eight lignin-degrading bacterial strains from the citrus waste compost. Among them, strain LDB1 had the strongest enzyme activity and was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* (GenBank No. OR244332). The lignin degradation by LDB1 was affected by pH, inoculum amount, and C/N ratio. The fermentation with LDB1 at pH 6.9, inoculum amount of 2.9%, and C/N ratio of 29.0 achieved the lignin degradation rate of (14.9±0.9)% after 4 days, which increased by 2.0% compared with the orthogonal test result. After 30 days, the lignin degradation rates of LDB1 for citrus branches, maize straw, and rice straw were 12.0%, 36.8%, and 30.6%, respectively. **[Conclusion]** *B. amyloliquefaciens* LDB1 can simultaneously secrete three lignin-degrading enzymes to destroy the lignocellulose structure, demonstrating strong lignocellulose-degrading ability.

Keywords: citrus waste; lignin-degrading; enzyme activity; *Bacillus amyloliquefaciens*; condition optimization

柑橘是世界上种植面积最广的水果之一，柑橘剪枝、疏果等措施产生了大量的有机废弃物，其中柑橘枝年均修剪量达 15–18 t/ha^[1]，其处置方式通常为堆置、焚烧或填埋，造成环境污染和资源浪费^[2]。堆肥是一种通过微生物作用将废弃物资源化利用的传统技术，但由于柑橘枝木质化程度高、木质素单体间碳碳键和醚键连接的多样性及木质素对水解酶的抗性阻碍了微生物对木质素的有效利用^[3-4]。研究表明接种

高效木质素降解菌是促进木质素降解的有效措施之一^[5-8]。

真菌是研究最广泛的木质素降解菌，一般分为白腐真菌、褐腐真菌和软腐真菌^[9]，其中白腐真菌如黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*)、虫拟蜡菌 (*Ceriporiopsis subvermispora*)等降解木质素的能力较强^[10]，它们分泌的胞外氧化酶如漆酶(laccase, Lac)、锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)和木质素

过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP),可作用于木质素,断裂木质素内部醚键和碳碳键并去除侧链^[11]。除了真菌外,一些细菌也可以高效降解木质素,而且比真菌更具特异性^[12]。有研究人员从土壤、海洋、堆肥、腐烂木材、污泥和动物肠道等生态系统中分离出多种木质素降解细菌^[9,13],包括变形菌少动鞘氨醇单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*) SYK-6、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) L-12^[14]、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) SL-7 和 HZ11^[15-16]、嗜热短芽芽孢杆菌(*Bacillus thermoruber*) GX5^[17]、绿孢链霉菌(*Streptomyces viridosporus*) T7A 和白色链霉菌(*Streptomyces albobriseolus*)^[9]、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) mt-2^[18]和 KT2440^[19],以及浑浊红球菌(*Rhodococcus opacus*) PD630 和约氏红球菌(*Rhodococcus jostii*)^[20]等。其中,关于链霉菌和芽孢杆菌的研究相对较多,不同菌株对木质素的降解能力存在显著差异^[15,21-23],与菌株生长条件也密切相关。李锋^[4]从白蚁肠道中筛选出一株解鸟氨酸拉乌尔菌(*Raoultella ornithinolytica*) MP-132,发现该菌在偏碱环境中的木质素降解能力较强,pH 8.0 时降解率最高(25.3%);牛佳钰^[17]从污泥和玉米秸秆堆肥中筛选出一株嗜热短芽芽孢杆菌 GX5,55 °C时菌株对木质素的降解率达到 81.9%;李彩联等^[24]通过优化真菌灵芝(*Ganoderma lucidum*) GI-16 的发酵条件,使其 Lac 酶活性提高了 2.06 倍;韩宇杰等^[25]从腐

木土壤中筛选出一株变栖克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*) BJ5,通过优化培养条件显著提升了 Lac、LiP 和 MnP 的酶活性,木质素降解率达到 21.6%。由此可知,优化菌株的生长条件如 pH、温度、接种量和通氧量等可以有效提高菌株对木质素的降解能力。

相较于外源微生物,土著微生物通常具备较强的环境适应性和竞争力,堆肥中接种土著微生物可以更快地促进堆体升温^[17]。因此,为加强柑橘废弃物(修剪枝、废弃果)的资源化利用,本研究拟从柑橘废弃物堆肥中筛选木质素降解细菌,对比不同细菌降解木质素的能力确定目的菌株,通过单因素试验、正交试验和响应面试验优化和验证目的菌株降解木质素的最佳条件,进一步评估目的菌株对不同底物木质素的降解能力和应用潜力。本研究旨在为柑橘废弃物高效堆肥提供菌株资源和参考。

1 材料与方 法

1.1 样 品

菌株筛选样本来自华中农业大学柑橘园的柑橘废弃物堆肥。采用露天堆肥方式,将柑橘枝、树叶和废弃果按比例(7:1:2)混合,柑橘枝粉碎粒径为 0.5–2.0 cm,添加 5%尿素调整初始碳氮比(C/N)。堆肥前 7 天每天翻堆 1 次,当堆肥温度达到 50 °C时(第 5 天),从堆肥不同方位采集 4 份样品混合保存于 4 °C泡沫箱。各物料的基本理化参数见表 1。

表 1 堆肥物料的基本性质

Table 1 Basic properties of compost materials

原料 Material	pH	含水量 Moisture content (%)	有机碳 Organic carbon (%)	总氮 Total nitrogen (%)	碳氮比 C/N
柑橘枝 Citrus branch	5.69±0.01	59.6±0.6	59.2±1.5	1.3±0.2	55.8±3.1
柑橘树叶 Citrus leaf	5.54±0.04	65.0±0.6	40.7±1.3	1.9±0.5	21.4±1.0
残次果 Inferior fruit	4.41±0.10	88.5±0.8	47.2±0.5	1.3±0.1	36.9±1.5
混合原料 Mixed material	5.41±0.12	65.3±4.1	55.0±3.7	1.7±0.3	32.3±2.2

1.2 培养基

碱木质素液体培养基(g/L): 碱木质素 5.2, Na_2HPO_4 2.8, KH_2PO_4 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.053, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 微量元素 1.0 mL^[4], pH 6.8–7.2。

碱木质素固体培养基: 碱木质素液体培养基中添加 35.0 g/L 琼脂。

LB 琼脂-苯胺蓝培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0, 苯胺蓝 0.1, pH 6.8–7.2。

柑橘枝/水稻/玉米降解培养基: 5.0 g 柑橘枝、水稻或玉米(40 目)分别代替碱木质素液体培养基中的碱木质素, 柑橘枝、水稻和玉米秸秆取自华中农业大学试验田。

培养基均 121 °C 灭菌 30 min。

1.3 培养基和主要试剂、仪器

LB 琼脂、琼脂粉、LB 肉汤, 海博生物技术有限公司。碱木质素、苯胺蓝, 源叶生物科技有限公司; 藜芦醇、2,6-二甲基苯酚、ABTS, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 氯化锰、酒石酸钠、柠檬酸钠、醋酸钠、醋酸、酒石酸、柠檬酸, 国药集团化学试剂有限公司。

超净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司; 恒温水浴锅, 天津泰斯特仪器有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 恒温摇床, 上海南荣实验室设备有限公司; 高压灭菌锅, 上海申安医疗器械有限公司; 高速离心机, Eppendorf 公司; 生化培养箱, 北京市永光明医疗仪器有限公司; 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM), NTC 公司; 傅里叶变换红外光谱仪(Fourier transform infrared spectrometer, FTIR), 布鲁克公司; 纤维素分析仪, 北京莱阔生物科技有限公司。

1.4 木质素降解菌的筛选、鉴定

取 10 g 堆肥嗜热期样品加入 90 mL 无菌水

后振荡 1 h, 静置 15 min。将上清液按 10^{-3} – 10^{-6} 梯度稀释, 吸取不同梯度稀释液至碱木质素固体培养基, 涂布均匀后放入 35 °C 培养箱中倒置培养。当培养基长出清晰的菌落后挑取形态不同的单个菌落, 在相同条件下划线培养, 直至获得纯化菌株。将纯化菌株接种于 LB 琼脂-苯胺蓝培养基进行复筛, 挑选使培养基褪色的细菌, 观察记录菌落形态。将复筛菌株添加到含有 50% 甘油的冻存管中, 保存于 -80 °C 冰箱。委托上海派森诺生物工程公司鉴定菌株的 16S rRNA 基因序列(图 1) (部分插图来自 <https://bioicons.com>)。

用 NCBI BLAST 程序将序列进行比对, 得到与待测物种序列相似性最大的物种信息, 将测序结果上传到 GenBank 数据库, 获得菌株 16S rRNA 基因序列的登录号, 用 MEGA 11.0 构建目的菌株的系统发育树。

1.5 菌株性能研究

1.5.1 菌株产酶能力对比

菌株在 LB 液体培养基中培养 24 h 作为种子液, 在锥形瓶中加入 40 mL LB 液体和 1% 的种子液, 35 °C、180 r/min 培养 4 d, 在相同条件下以灭活后的种子液培养作为空白, 实验重复 3 次。每隔 24 h 取样 1 次, 4 °C、50 000 r/min 离心 10 min 后取上清液为粗酶液, 检测菌株酶活, 酶活测定具体步骤如下。

LiP 酶活测定^[26]: 在 3.0 mL 反应体系中加入 1.6 mL 酒石酸钠缓冲液(pH 3.0)、0.3 mL 藜芦醇和 1 mL 酶液, 30 °C 水浴锅中预热 3 min, 加入 0.1 mL H_2O_2 , 于 310 nm 测定 1 min 内的吸光度变化。

MnP 酶活测定^[27]: 在 3.0 mL 反应体系中加入 2.4 mL 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5)、0.1 mL 2,6-DMP 和 0.4 mL 酶液, 30 °C 水浴锅中预热

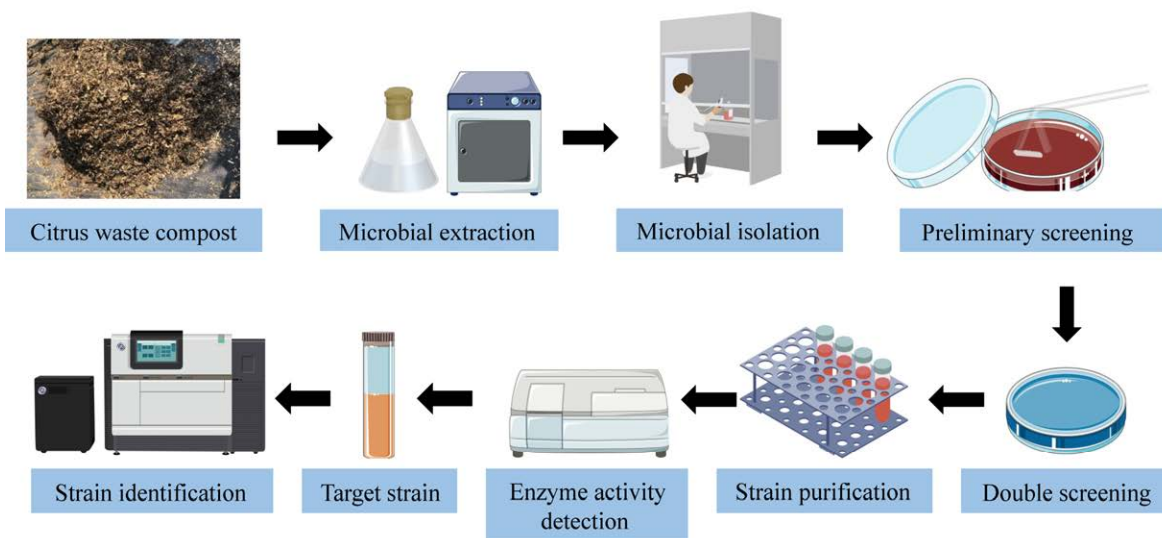


图1 木质素降解菌筛选流程

Figure 1 Screening process of lignin degrading bacteria.

3 min, 加入 0.1 mL H_2O_2 , 于 469 nm 测定 1 min 内的吸光度变化。

Lac 酶活测定^[15]: 在 3 mL 反应体系中加入 0.2 mL ABTS 溶液和 2.7 mL 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5), 30 °C 水浴锅中预热 3 min, 加入 0.1 mL 酶液, 于 420 nm 测定 1 min 内的吸光度变化。

以上实验均以灭活(121 °C, 20 min)的酶液为对照, 重复 3 次。单位时间内 1 mL 酶液使反应体系吸光度增加 0.01 定义为 1 个酶活力单位(U), 酶活计算公式为:

$$C(U/L) = \frac{10^6}{\epsilon} \times \frac{V_{total}}{V_{sample}} \times \frac{\Delta OD}{\Delta t} \quad (1)$$

式(1)中: ϵ 为消光系数, mol/(L·cm); Lac、MnP 和 LiP 的 ϵ 值分别为 3.6×10^4 、 4.96×10^4 和 9.3×10^3 ; V_{total} 为测定样品总体积, mL; V_{sample} 为木质素上清液体积, mL; ΔOD : 吸光度变化值; Δt 为测定间隔时间, min。

1.5.2 菌株形态和生化特性

将目的菌株 LDB1 在 LB 培养基中 27 °C、

180 r/min 培养 7 d, 每天测定菌株的吸光度 (OD_{600}) 以检测菌株的生长状况。取部分菌液进行革兰氏染色, 置于光学显微镜下观察菌体形态。同时, 采用扫描电镜观察菌体细胞图像。按照参考文献[28-29]分别对菌株进行耐热性、耐盐性、淀粉水解、硝酸盐还原、明胶液化、纤维素分解和脂肪降解等生理生化试验, 试验设置 3 组重复。

1.6 降解条件对菌株的影响

以木质素液体培养基作为优化实验的培养基, 温度、接种量、转速、初始 pH 和 C/N 作为优化变量, 探究菌株的木质素降解能力。

制备浓度为 10、20、40、60、80 和 100 mg/L 的木质素标准溶液, 先用 NaOH 溶液将木质素溶液 pH 值调节为 12.0 以溶解木质素, 然后用 HCl 将溶液 pH 调节为中性。通过紫外可见分光光度计测定上清液的 OD_{280} 值。实验组接种菌株 LDB1, 对照组接种灭活菌株, 以对照调零分光光度计, 每天测量实验组和对照组上清液的 OD_{280} 值, 求得培养液中的木质素含量。木质素

降解率计算公式如下:

$$\text{降解率}(\%) = (C_1 - C_2) / C_1 \times 100 \quad (2)$$

式(2)中: C_1 为对照组中木质素的浓度(mg/L), C_2 为实验组中木质素的浓度(mg/L)。

1.6.1 单因素试验

以木质素降解率为指标,分析温度(30、35、40、45、50、55 °C)、接种量(0.1%、0.5%、2.0%、4.0%、10.0%)、转速(120、160、200、240、280 r/min)、初始 pH 值(4.0、5.5、7.0、8.5、10.0)和 C/N (15、20、25、30、35、40)对菌株 LDB1 降解木质素的影响,试验在 38 °C 的条件下培养 9 d,重复 3 次。用 0.5 mol/L 氢氧化钠和 1% 盐酸调节 pH,用尿素和葡萄糖调节 C/N。

1.6.2 正交试验

单因素试验确定了 5 个变量(温度、pH、C/N、转速和接种量)影响菌株降解木质素的最佳范围。由于在 35 °C 和 40 °C 时,菌株的木质素降解率基本一致,为减少工作量,本试验选择 38 °C 为后续试验温度,通过正交试验(表 2)进一步确定其余变量对木质素降解率的影响。菌株 LDB1 在第 88 h 的酶活性最高,所以正交试验选择在 38 °C 条件下培养 4 d,重复 3 次。

表 2 正交试验设计及结果

Table 2 Orthogonal experimental design and result

No.	pH	转速 Rotational speed (r/min)	接种量 Inoculum amount (%)	碳氮比 C/N	木质素降 解率 Lignin degradation rate (%)
1	5.5	160	0.5	25	12.1
2	5.5	200	2.0	30	12.9
3	5.5	240	4.0	35	10.4
4	7.0	160	2.0	35	11.2
5	7.0	200	4.0	25	11.9
6	7.0	240	0.5	30	12.5
7	8.5	160	4.0	30	9.9
8	8.5	200	0.5	35	9.3
9	8.5	240	2.0	25	9.5

1.6.3 响应面试验

单因素试验和正交试验确定了菌株降解木质素的最佳条件范围和关键影响因子,通过三因素三水平的响应面试验确定准确培养条件。Box-Behnken design (BBD) 试验设计与本试验的三因素三水平要求最匹配,所以选择 BBD 方法并建立模型,分别以 A、B、C 代表 pH (5.5、7.0、8.5)、接种量(1.0%、2.5%、4.0%)、C/N (25、30、35), -1、0、1 代表各水平的最低值、平均值、最大值,试验在 38 °C 的条件下培养 4 d,重复 3 次。

1.7 柑橘枝降解试验

在柑橘枝降解培养基中接种 2.9% 的菌液, pH 值和 C/N 分别调节为 6.9 和 29,于 38 °C、200 r/min 培养 30 d,每 10 d 取样 1 次,样品真空冷冻干燥后保存。一部分样品用 Van Soest 法^[30]和纤维素分析仪测定枝条半纤维素、纤维素和木质素含量;一部分样品经临界点干燥法进行干燥,然后将干燥样品均匀粘在导电胶带上制作 SEM 样本,喷金处理后置于 SEM 样品仓内观测柑橘枝条降解后的微观形貌变化;一部分样品与干燥溴化钾粉末(1:200)混合研磨至 2 μm 左右,用压片机将 1-2 mg 混合样制成厚度约为 1 mm 的薄片,放入傅里叶变换红外光谱仪,扫描范围为 500-4 000 cm⁻¹,分析柑橘枝条降解后的结构和官能团变化。试验均以灭活菌株为对照。

1.8 作物秸秆降解试验

在水稻和玉米秸秆培养基中接种 2.9% 的菌液,以添加灭活菌株的培养基为对照,培养 30 d 后测定秸秆的半纤维素、纤维素和木质素含量,培养和分析方式同 1.7。

1.9 数据分析

使用 Excel 2016 软件整理数据,SPSS 计算实验结果的平均值和标准误。使用单因素方差分析(one-way ANOVA)确认数据的变异性 and 结

果的有效性, 正交试验由 SPSS 18 分析, 响应面试验由 Design Expert 12 建模分析。所有数据由 Excel 2016、Origin 2017 和 Design Expert 12 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 堆肥中的木质素降解菌

经初筛和复筛后, 从柑橘废弃物堆肥样品中获得了 8 株具有木质素降解能力的细菌, 它们在 LB 琼脂-苯胺蓝培养基中的褪色反应如图 2 所示, 菌株分别编号为 LDB1、LDB2、LDB3、LDB4、LDB5、LDB6、LDB7 和 LDB8。

2.2 菌株的产酶能力

Lac、LiP 和 MnP 是公认的降解木质素最重要的三类酶, 得到上述 8 株具有木质素降解能力的菌株后, 进一步检测其酶活, 选出产酶能力强、生长活性高的菌株用于后续菌株的研究和堆肥应用。

由图 3A–3H 可知, 在 8 株细菌中, 菌株 LDB1、LDB2、LDB4、LDB6 和 LDB7 能同时产生 LiP、MnP 和 Lac, 它们可能具备较强的木

质素降解能力。培养 64 h 后, 菌株 LDB1 产生这 3 种酶的能力最强, 分别达到了 (175.62 ± 27.09) 、 (1.59 ± 0.11) 和 (5.83 ± 0.39) U/mL (图 3A)。菌株 LDB1 停滞期较短, 0–36 h 处于生长指数期, 48–84 h 处于生长稳定期, 培养 84 h 后进入生长衰亡期(图 3I)。为确保菌株稳定进入平台期, 选取 0–88 h 作为实验周期进行后续实验。

2.3 菌株 LDB1 的生化性能和鉴定

菌株 LDB1 在显微镜油镜和扫描电镜下的形态如图 4 所示, 革兰氏染色阳性, 菌体较小, 呈椭圆短链杆状排列。菌株的生理生化特性结果见表 3。

将菌株 LDB1 测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 同源性分析, 发现菌株 LDB1 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的亲缘关系最近, 相似性为 99.7%, 可以确定菌株 LDB1 为解淀粉芽孢杆菌。基于 BLAST 相似性比对结果, 菌株 LDB1 的系统发育树见图 5。将菌株 LDB1 测序结果上传到 GenBank 数据库, 获得菌株的登录号为 OR244332, 菌株 LDB1 在 CCTCC 的保藏号为 M20231897。

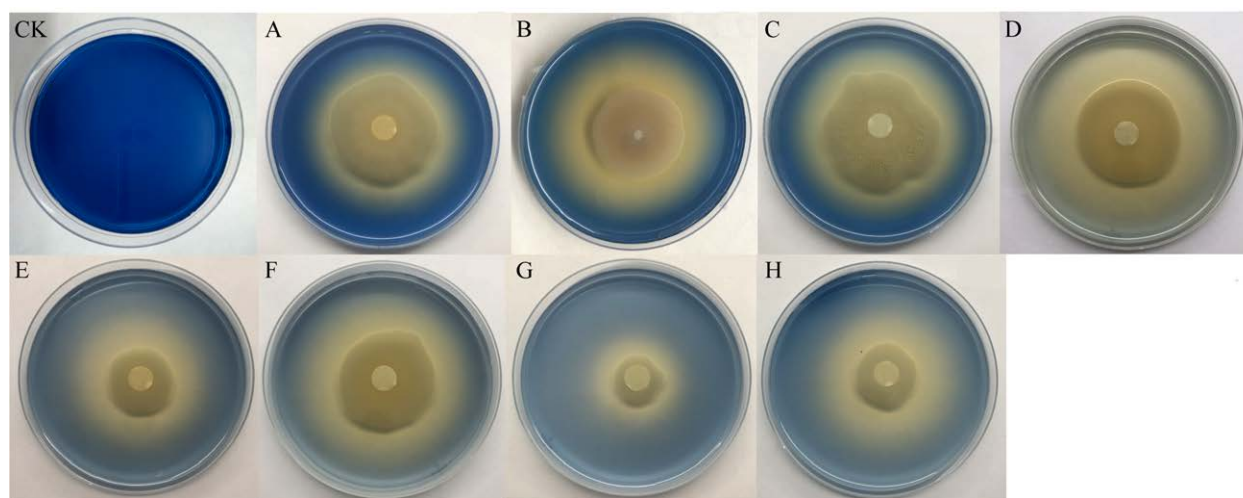


图 2 细菌在 LB 琼脂-苯胺蓝培养基中的褪色反应 CK: 对照; A–H 分别为菌株 LDB1–LDB8。

Figure 2 Fading reaction of bacteria in LB agar aniline blue medium. CK: The control; A–H: Strains LDB1–LDB8.

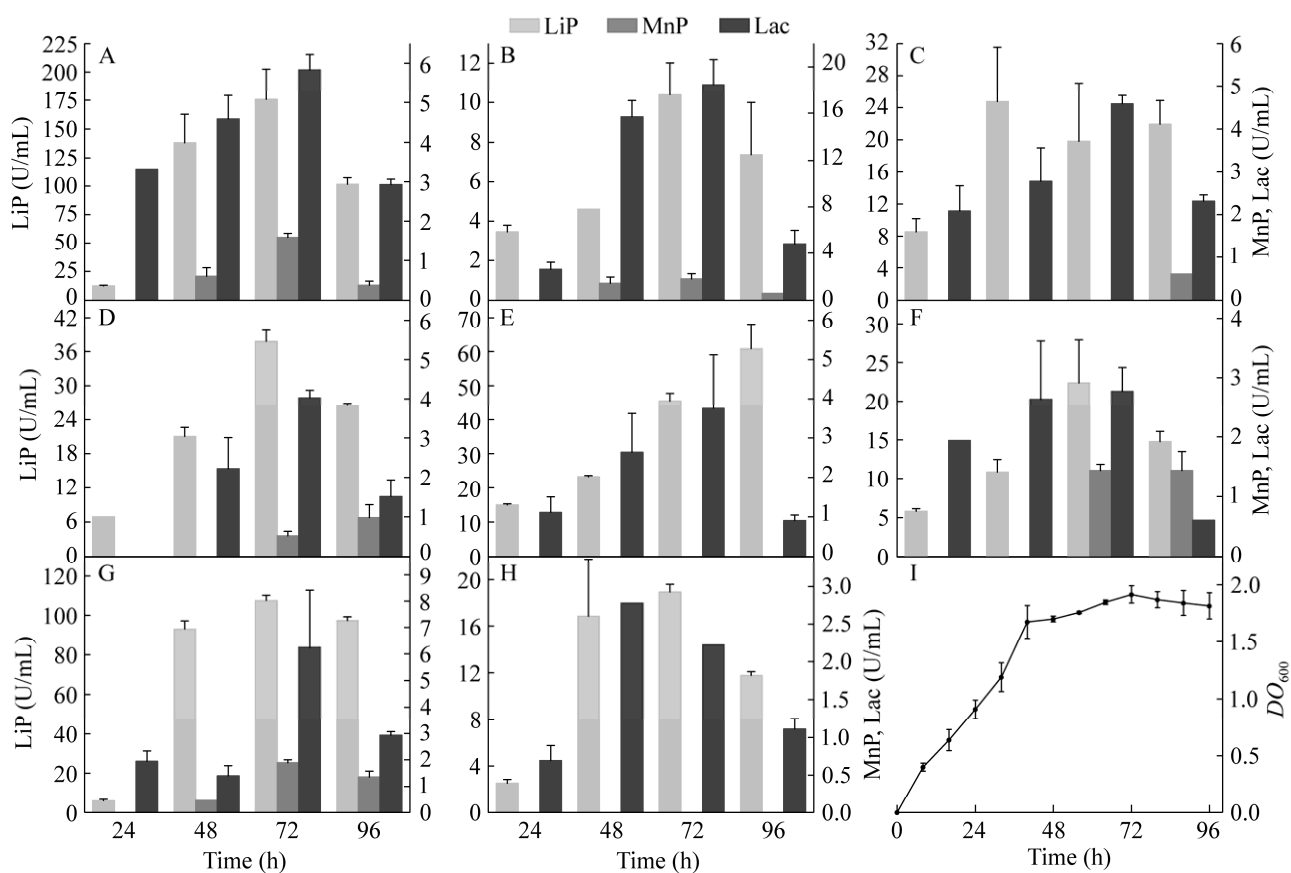


图3 八株细菌的产酶能力和菌株 LDB1 的生长曲线 A-H: 菌株 LDB1-LDB8 的酶活性; I: LDB1 的生长曲线。

Figure 3 Enzyme-producing capacity of bacteria and growth curve of strain LDB1. A-H: Enzyme activity of strains LDB1-LDB8; I: Growth curve of strain LDB1.

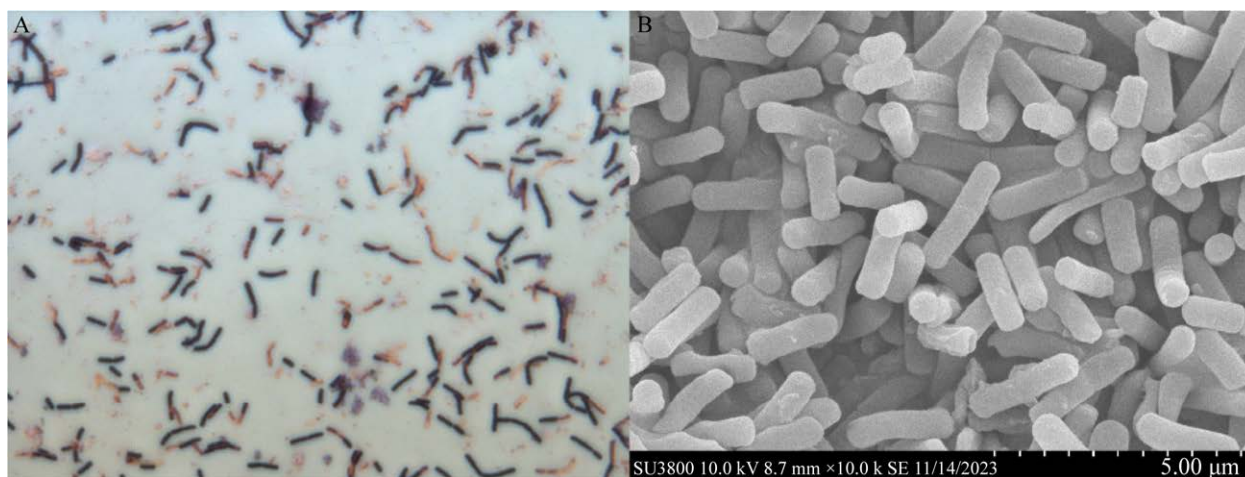


图4 菌株 LDB1 的革兰氏染色图(A)和扫描电镜图(B)

Figure 4 Gram staining (A) and scanning electron microscopy (B) of strain LDB1.

表3 菌株 LDB1 的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain LDB1

实验 Experiment	结果 Result
明胶液化 Gelatin liquefaction	-
纤维素降解 Cellulose decomposition	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
脂肪降解 Fat degradation	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
吲哚生成 Indole production	-
脲酶 Urease	+
40 °C耐热性 40 °C hot tolerant	+++
50 °C耐热性 50 °C hot tolerant	++
60 °C耐热性 60 °C hot tolerant	+
2%耐盐性 2% salt tolerant	+++
4%耐盐性 4% salt tolerant	++
6%耐盐性 6% salt tolerant	+
8%耐盐性 8% salt tolerant	+

+: 阳性, 越多表明生长越好; -: 阴性。

+: Positive, the more, the better the growth; -: Negative.

2.4 菌株 LDB1 降解木质素的条件优化

2.4.1 单因素试验结果

温度和 pH 与微生物生理生化特性密切相关, 它们过高/过低都会降低微生物代谢活性。温度为 35 °C 和 40 °C 时(图 6A), 木质素降解率基本相同, 分别为(59.5±2.7)%和(59.5±1.2)%, 可知菌株的适宜培养温度范围应在 35-40 °C 之间。由图 6B 可知, 当 pH 7.0 时, 木质素降解率达到最大, 为(45.8±2.2)%, 所以该菌产生的酶综合效应的最适产酶 pH 值为 7.0。

如图 6C 所示, 随着菌株接种量增加, 木质素降解率先上升后下降, 说明在一定范围内增加接种量能够加快微生物繁殖, 提高木质素降解率。接种量达到 2.0% 时, 木质素降解率达到最大值, 为(45.9±5.6)%, 而进一步提升接种量导致木质素降解率降低, 可能是过高的接种量

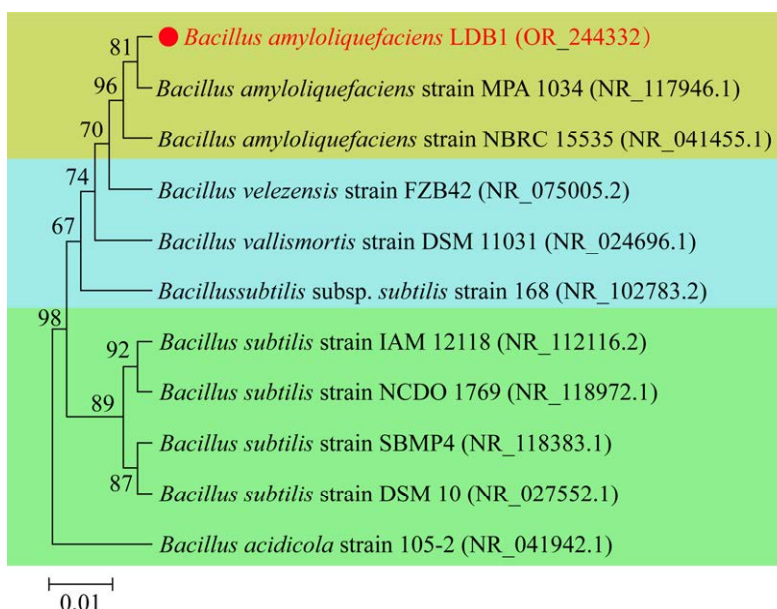


图5 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 LDB1 系统发育树 分支点上的数字为自展值, 代表进化树分支可信度的百分比; 标尺 0.01 表示 1% 的序列分歧; 括号内为相应的 GenBank 登录号。

Figure 5 Phylogenetic tree of strain LDB1 constructed based on 16S rRNA gene sequence. The numbers at the branch points are the self-spread values representing the percentage of the evolutionary tree branch confidence; The scale 0.01 indicates 1% of sequence divergence; The corresponding GenBank serial number is in parentheses.

加剧了菌株对碳源和氮源的种内竞争, 导致繁殖速率下降。因此最适合菌株产酶的接种量为 2.0%。

由图 6D 可知, C/N 显著影响菌株对木质素的降解率。C/N 过高会因氮源不足而减缓微生物代谢活动, C/N 过低会因碳源不足而缺少能量, 导致微生物对木质素分解缓慢。本研究中 C/N 为 30 时, 木质素降解率达到最高, 为(58.4±1.2)%。因此该菌产酶的最适 C/N 宜为 30。

转速与培养液中的溶解氧含量正相关。由图 6E 可知, 转速增加为 200 r/min 时, 菌株的木质素降解率达到最大, 为(39.1±1.3)% , 此时培养瓶中的溶解氧含量已满足菌株正常生命活

动, 进一步提升转速可能会导致剪切力增加, 对菌株产生压迫, 降低木质素降解率。由此可知菌株产酶的最适摇瓶转速为 200 r/min。

根据单因素试验结果, 可确定菌株降解木质素的最适温度、pH、接种量、转速和 C/N 范围分别为 35–40 °C、5.5–8.0、0.5%–4.0%、160–200 r/min 和 25–35, 当温度、pH、接种量、转速和 C/N 分别为 35 或 40 °C、7.0、2.0%、200 r/min 和 30 时, 木质素降解率最高。

2.4.2 正交试验结果

在单因素试验基础上进一步开展正交试验, 分析 4 个因子对菌株降解木质素的影响, 结果分析见表 4。

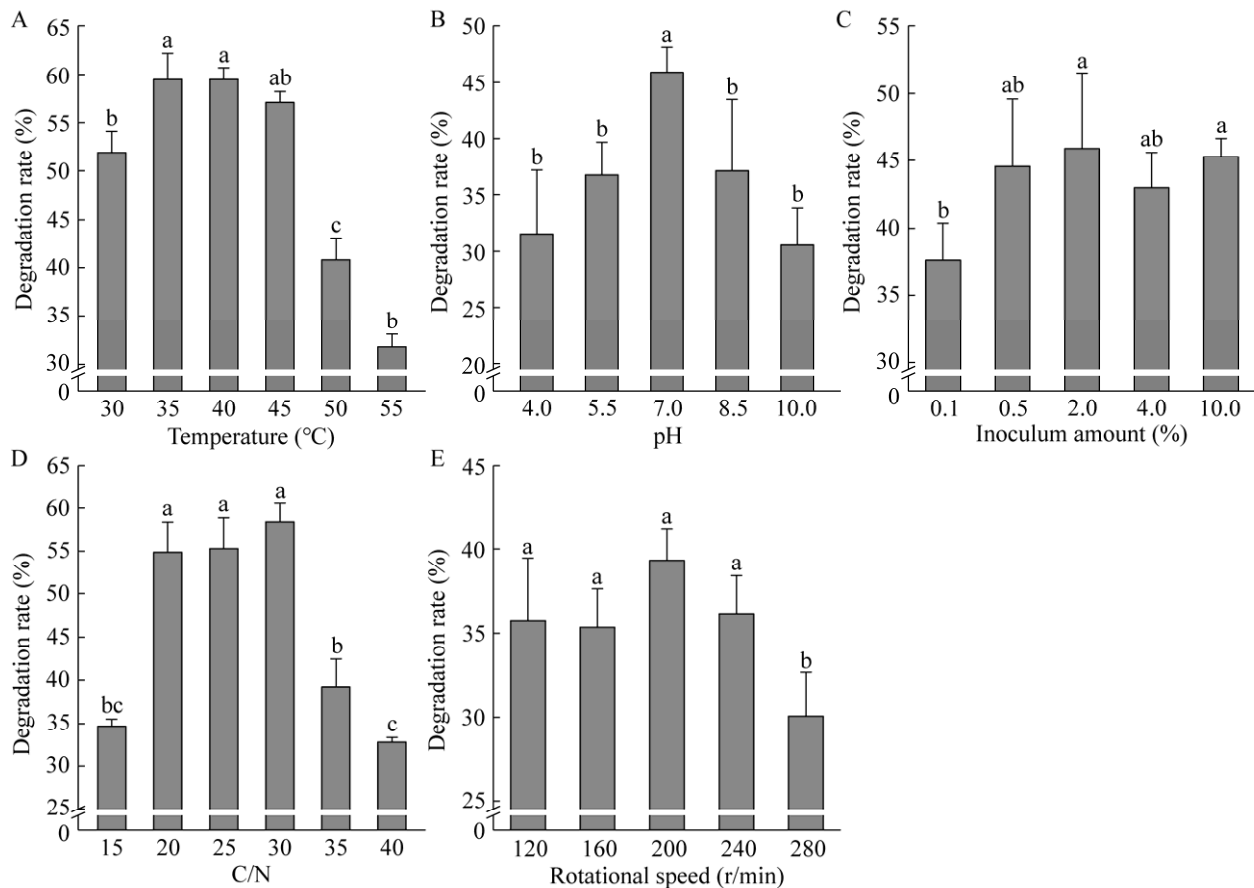


图 6 不同条件下菌株 LDB1 的木质素降解率 不同小写字母表示不同条件间差异显著($P < 0.05$)。下同。

Figure 6 Lignin degradation rate of strain LDB1 under different conditions. Different lowercase letters on the bar chart at the same time indicate significant differences among different conditions ($P < 0.05$). The same below.

表 4 正交试验木质素降解率极差分析

Table 4 Range analysis of lignin degradation rate by orthogonal test

来源 Source	水平 Level	pH	转速 Rotational speed	接种量 Inoculum amount	碳氮比 C/N
<i>K</i> 值	1	35.43	34.34	33.90	32.54
<i>K</i> value	2	35.74	33.20	34.71	35.32
	3	28.74	32.38	31.30	32.05
<i>K</i> 均值	1	11.81	11.45	11.30	10.85
<i>K</i> avg	2	11.92	11.07	11.57	11.77
	3	9.58	10.79	10.43	10.68
<i>R</i>		2.34	0.65	1.14	1.09
最适水平 Optimum level		2	1	2	2
顺序 Order		pH>Inoculum amount>C/N>Rotational speed			
重复 Replicates		3	3	3	3

R 表示不同因子对结果的影响幅度, 影响菌株降解木质素最显著的是 pH, 其次是接种量和 C/N, 转速影响最小, 转速 200 r/min 是最佳水平。因此, 选定影响最大的因子(pH、接种量和 C/N)作为响应面试验的研究对象, 转速确定为 200 r/min。

2.4.3 响应面试验结果

响应面试验设计结果见表 5。通过多元拟合分析得出降解率(*Y*)与自变量 *A*、*B*、*C* 的多元二次回归方程为: $Y=13.66-0.502 3A+0.961 4B-0.351 4C+0.396 9AB+1.58AC+1.58BC+10.29A^2+13.61B^2+6.01C^2$ 。根据表 6 多元回归方程方差和显著性分析结果可知, 回归模型极显著 ($P<0.000 1<0.01$), 模型响应值拟合良好。一次项(*A*、*B* 和 *C*)、二次项(A^2 、 B^2 和 C^2)和交互项(*AC*、*BC*)都达到显著水平 ($P<0.05$), 但 *AB* ($P>0.05$)对木质素的影响不显著。试验失拟项 (0.17)大于 0.05, 表明模型与试验拟合程度高, 试验结果可靠。模型决定系数 $R^2=0.997 1$, 模型相关性良好, 可以较好地响应值变化分析, 同时预测 $R_{pred}^2=0.933 7$, 校正 $R_{adj}^2=0.952 8$, 二者差值小于 0.2, 表示菌株 LDB1 降解木质素的二次回归拟合度良好, 自变量与响应值之间存

在显著的线性关系。信噪比为 17.754 $2>4$, 说明模型试验设计可靠, 可用该模型方程预测最佳木质素降解条件。

表 5 响应面设计及实验结果

Table 5 Response surface design and experimental results

No.	pH	接种量 Inoculum amount	碳氮比 C/N	降解率 Degradation rate (%)
1	0	0	0	13.4
2	0	1	1	10.7
3	0	-1	-1	9.3
4	0	0	0	13.9
5	-1	-1	0	10.3
6	0	0	0	14.4
7	-1	1	0	11.5
8	0	-1	1	10.1
9	1	-1	0	8.4
10	1	0	1	9.4
11	1	1	0	11.0
12	1	0	-1	11.5
13	0	0	0	13.2
14	-1	0	1	11.5
15	0	0	0	13.4
16	-1	0	-1	11.1
17	0	1	-1	12.5

表 6 响应面回归方程分析

Table 6 Analysis of response surface regression equation

来源	F 值	P 值	显著性
Source	F value	P value	Significance
模型 Model	36.85	<0.000 1	**
A	14.15	0.007 1	**
B	51.86	0.000 2	**
C	6.93	0.033 8	*
AB	2.78	0.139 2	ns
AC	11.10	0.012 6	*
BC	11.09	0.012 6	*
A ²	72.16	<0.000 1	**
B ²	95.67	<0.000 1	**
C ²	42.16	0.000 3	**
失拟项 Missing fit	0.17	0.910 3	/

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: $P > 0.05$; /: Not exist.

2.4.4 各因素的响应曲面及等高线分析

模型的等高线图和三维响应面立体图结果如图 7-9 所示。立体图的陡峭程度和等高线的形状反映变量对木质素降解率的影响，曲面越陡、等高线形状越接近椭圆表示两因素交互作用

显著，反之则不显著。

由图 7 可以看出等高线近似为圆形，表示 pH 与接种量的交互作用没有显著影响木质素降解，随着 pH 与接种量增加，木质素降解率呈现出先增大后减小的趋势；图 8 中等高线为椭圆，响应面呈现明显凸形，表示 pH 与 C/N 的交互作用显著影响木质素降解，随着 pH 与 C/N 增加，木质素降解率呈现出先增大后减小的趋势；图 9 中等高线明显为椭圆，响应面呈凸形，表示接种量与 C/N 的交互作用对木质素降解影响显著，随着接种量与 C/N 增加，木质素降解率呈现出先增大后减小的趋势。以此可知，在 pH 为 7.0、接种量为 3%、C/N 为 30 条件下，菌株 LDB1 的木质素降解率高于 13%。

2.4.5 工艺条件验证

根据正交试验、响应面模型分析和响应值预测结果，可以确定菌株 LDB1 降解木质素的最佳工艺条件为温度 38 °C、转速 200 r/min、pH 6.86，接种量 2.94%，C/N 29.0，此条件下降解率达到

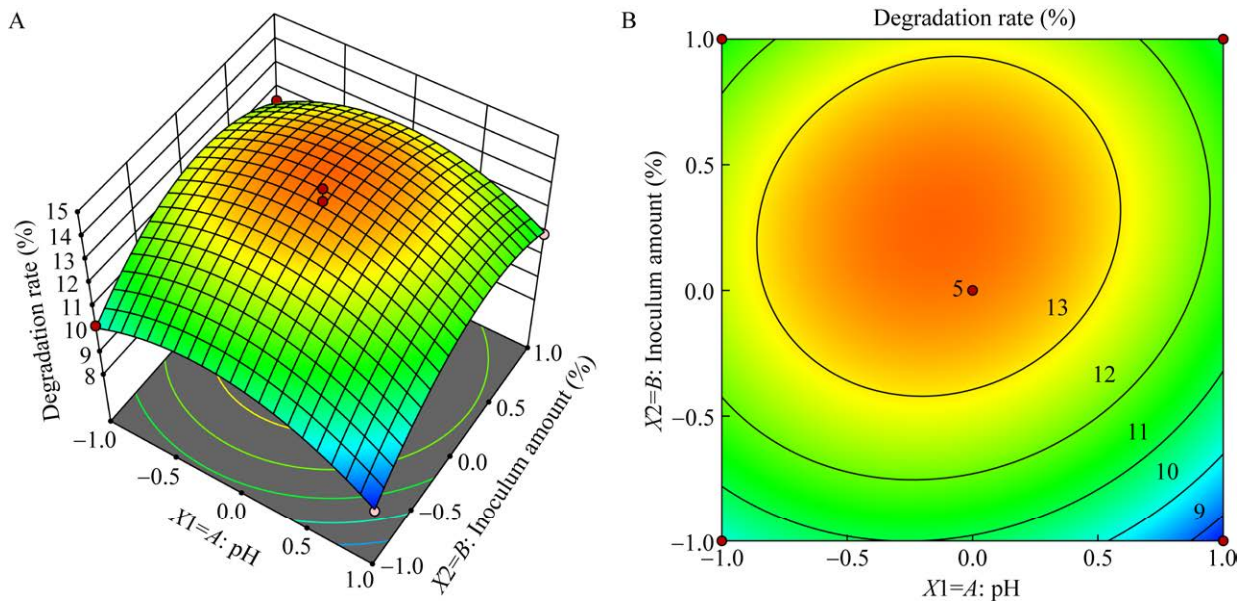


图 7 pH 和接种量对菌株降解木质素的响应面和等高线图

Figure 7 Response surface and contour map of pH and inoculum amount to lignin degradation by strains.

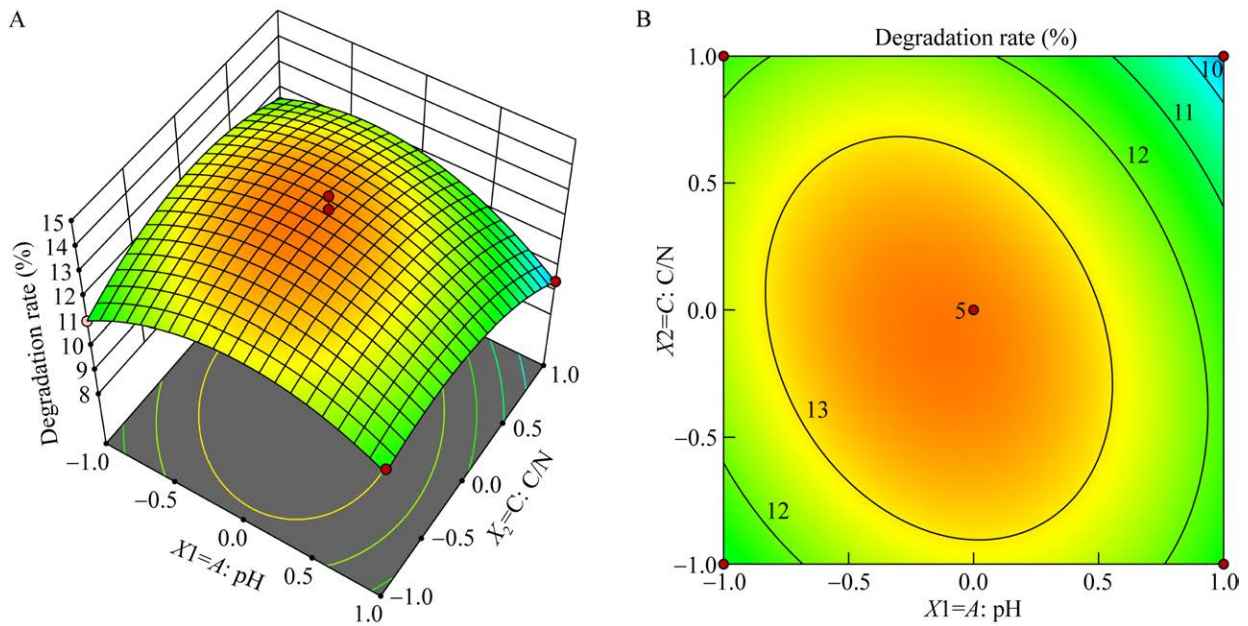


图 8 pH 和 C/N 对菌株降解木质素的响应面和等高线图

Figure 8 Response surfaces and contours of pH and C/N to lignin degradation by strains.

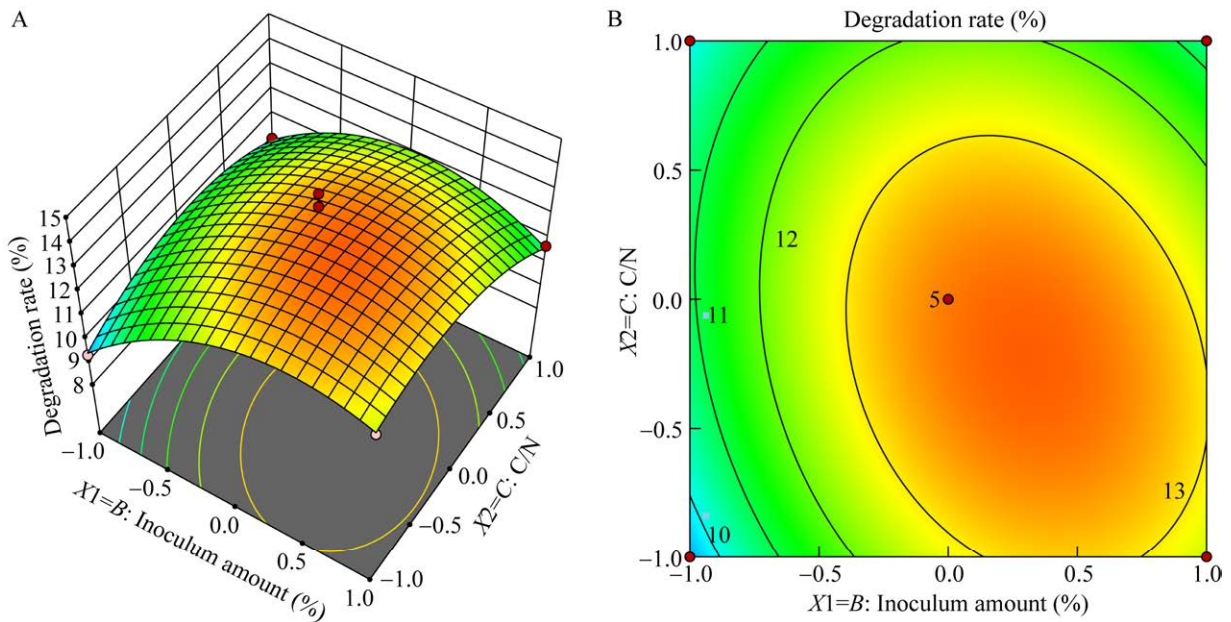


图 9 接种量和 C/N 对菌株降解木质素的响应面和等高线图

Figure 9 Response surface and contour map of inoculum amount and C/N to lignin degradation by strains.

(14.2±1.1)%。为验证结果的可靠性,采用上述条件结合实际情况,将最佳降解条件调整为 pH 6.9、接种量 2.9%, C/N 29.0, 进行 5 组平行试

验。4 d 后菌株的 LiP、MnP 和 Lac 酶活分别为 (214.5±22.41)、(2.03±0.15)和(7.88±0.22) U/mL, 木质素降解率达到(14.9±0.9)%, 与响应面模型

预测的结果相差较小,比正交试验中的最大木质素降解率提升了 2.0%,说明利用响应面法有效提高了菌株的木质素降解率。

2.5 菌株 LDB1 的降解效果

2.5.1 菌株 LDB1 的木质纤维素降解能力

菌株 LDB1 对不同植物源木质纤维素的降解效果如图 10 所示。柑橘枝的初始半纤维素、纤维素和木质素含量为 34.9%、29.9%和 19.6%,在 30 d 降解过程中,木质纤维素含量逐渐下降,其中菌株 LDB1 对半纤维素的降解率最高,为 27.4%,

其次是木质素(12.0%)、纤维素(7.1%) (图 10A),3 种成分的降解率在第 10、20 和 30 天的降解率都存在显著差异($P<0.05$) (图 10B)。在玉米和水稻秸秆降解过程中,玉米和水稻的干物质损失量分别增加了 21.6%和 21.0% (图 10C),玉米和水稻秸秆的半纤维素、纤维素、木质素降解率分别为 16.9%、35.9%、36.8%和 19.8%、29.0%、30.6% (图 10D)。由此可知,菌株 LDB1 对作物秸秆木质纤维素的降解能力比对柑橘枝的降解能力强。

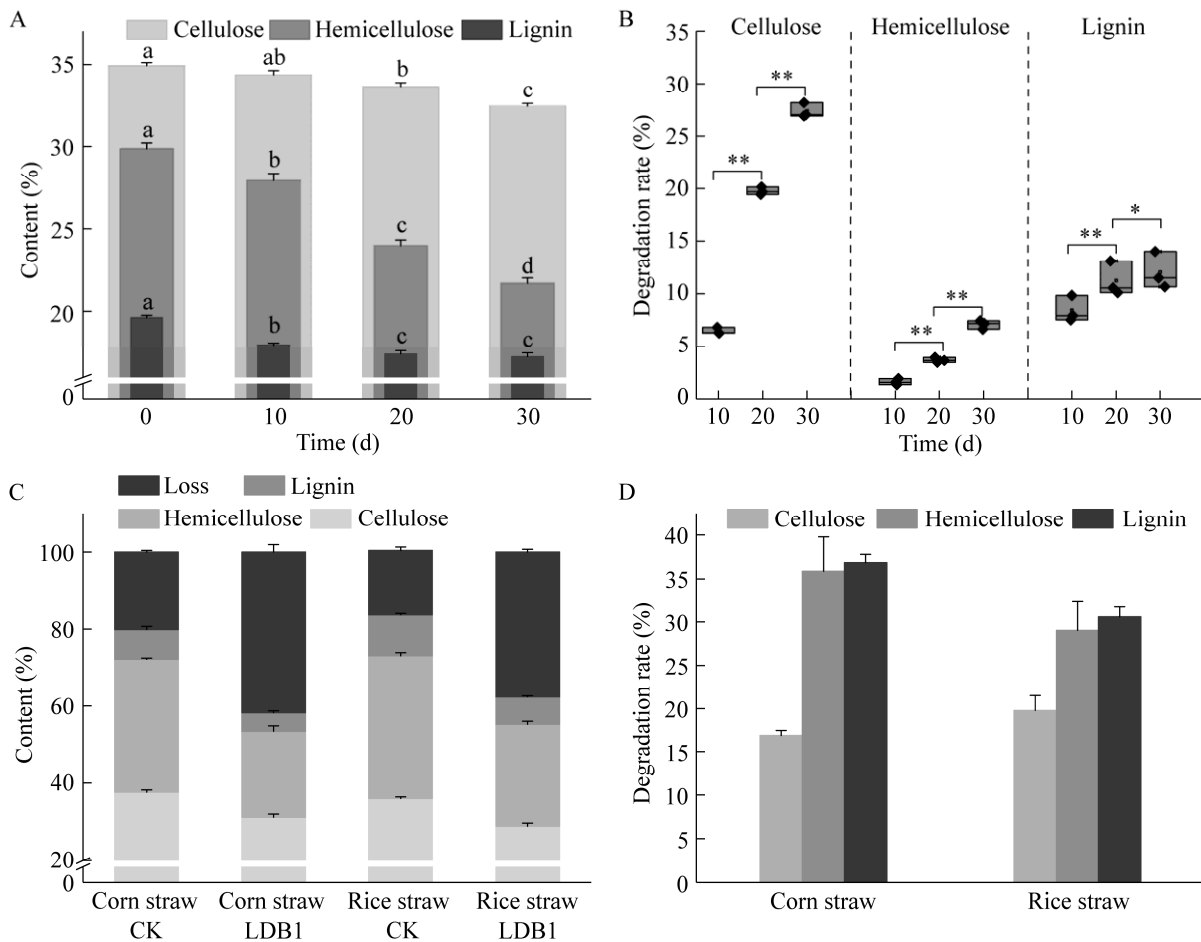


图 10 菌株 LDB1 的木质纤维素降解能力 A、B 分别为柑橘枝的木质纤维素含量和降解率变化; C、D 分别为水稻和玉米秸秆的木质纤维素含量和降解率变化。

Figure 10 Lignocellulosic degradation capacity of strain LDB1. A: Change of citrus branches' lignocellulose content; B: Change of citrus branches' lignocellulose rate; C: Lignocellulosic content of rice and corn straws; D: Lignocellulosic degradation rate of rice and corn straws. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

2.5.2 柑橘枝形貌变化

利用 SEM 观察降解前后柑橘枝的微观结构变化。如图 11 所示, 图 11A 为未处理柑橘枝呈现的原始结构状态, 表面相对光滑, 纹理结构清晰, 内部存在许多孔隙; 细菌降解 10 d (图 11B) 后, 细菌大量附着在表面和内部空隙中, 表面变得粗糙, 孔隙数量相对减少; 降解 20 和 30 d (图 11C、11D) 后, 柑橘枝被菌株 LDB1 进一步降解, 结构发生明显变化, 出现许多不规则的细小碎片。对比柑橘枝降解前后的微观结构变化, 证实菌株 LDB1 可以有效破坏柑橘的木质纤维结构。

2.5.3 傅里叶红外光谱 (FTIR) 分析

如图 12 所示, 经过菌株 LDB1 降解后, 柑橘枝中一些谱带的吸收率发生显著变化, 其变化

主要集中于 $800\text{--}1\ 800\text{ cm}^{-1}$ 。与 CK 相比, 菌株 LDB1 处理之后的 $1\ 606\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 596\text{ cm}^{-1}$ 峰强明显降低, 同时 $1\ 600\text{--}1\ 750\text{ cm}^{-1}$ 之间出现了 2 个新峰, 表明柑橘枝中降解后的木质素可能发生了侧链氧化、去甲基以及芳香环断裂。 $1\ 269\text{--}1\ 374\text{ cm}^{-1}$ 之间的峰强发生变化, $1\ 374\text{ cm}^{-1}$ 代表甲基中 C-H 伸缩, $1\ 269\text{ cm}^{-1}$ 代表愈创木酰基环振动与 C-O 的拉伸振动, 经菌株 LDB1 降解后, $1\ 374\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰消失, $1\ 269\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰降低。此外, 854 cm^{-1} 吸收峰属于 G 单体中 2、5、6 位置的 C-H 面外弯曲振动, 菌株 LDB1 处理后吸收峰相对吸收强度减小。这些吸收峰强度与柑橘枝中木质素、纤维素和半纤维素等物质的官能团和化学结构有关。

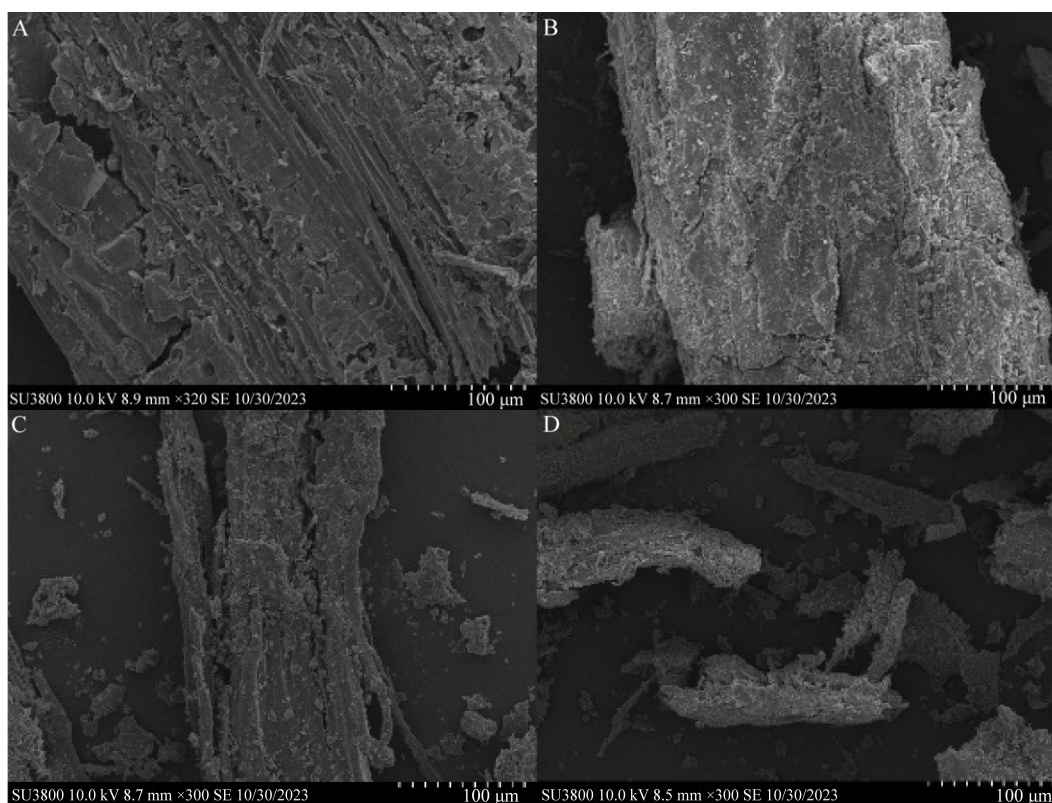


图 11 菌株 LDB1 降解前后柑橘枝的变化 A-D 分别是降解 0、10、20 和 30 d。

Figure 11 The changes of strain LDB1 degradation of citrus branch. A-D are degraded for 0, 10, 20 and 30 d, respectively.

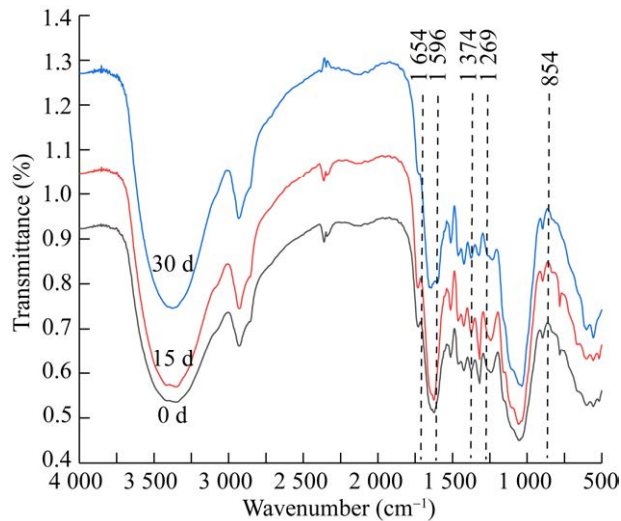


图 12 菌株 LDB1 降解柑橘枝红外光谱图
Figure 12 FTIR of strain LDB1 degradation of citrus branches.

3 讨论

本研究从柑橘枝废弃物堆肥样品中分离出具有木质素降解能力的细菌 8 株, 鉴定后均属于芽孢杆菌属, 其中产酶能力最强的是解淀粉芽孢杆菌 LDB1, 表明在以柑橘废弃物为碳源的堆肥中, 芽孢杆菌是可培养的降解木质素的优势物种, 这是首次在柑橘废弃物堆肥中筛选到木质素降解菌。木质素降解微生物产生并分泌的非特异性氧化酶系统(主要是 LiP、Lac 和 MnP)是降解木质素的关键, 通常被用于验证微生物降解木质素的能力^[9,31]。根据以往的报道, 大多数木质素降解菌只能产生 LiP、Lac 和 MnP 中的 1 种或 2 种^[32], 同时产生上述 3 种酶的微生物往往具备较强的木质素降解能力。Mei 等^[15]从烟草秸秆中筛出了一株分泌 LiP、Lac 和 MnP 的解淀粉芽孢杆菌 SL-7, 40 d 后烟草秸秆木质素的降解率达到 63.8%。Niu 等^[23]从污泥和秸秆堆肥中筛出一株嗜热短芽孢杆菌 GX5, 其 LiP、Lac 和 MnP 酶活达到 662.40、57.53 和 78.82 U/L, 使堆肥中木质素降解率增加了约

25%。余克非^[33]从园林废弃物堆肥中筛选出了 2 株具有木质纤维素降解能力的芽孢杆菌, 它们显著提升了堆肥腐熟期的 LiP (22.36 U/mL)、Lac (21.46 U/mL) 和 MnP (15.03 U/mL) 活力, 提高了木质素降解率。本研究中筛选出的菌株 LDB1 能分泌 3 种木质素降解酶, 同时具备耐高温性能和降解纤维素、半纤维素的能力。试验中 LDB1 对柑橘枝木质素的降解率略低, 但对玉米和水稻秸秆木质素的降解能力较强, 这可能是由于不同基质和培养条件影响了同一菌株的产酶能力和降解能力^[34], 而且柑橘枝木质素含量和紫丁香基比例高^[35], 导致柑橘枝比秸秆等禾本科作物难降解。

不同菌株对最佳培养条件的要求不同, 通常需要优化其培养条件, 响应面法优化被广泛应用于优化微生物培养条件^[36-37]。本研究选择温度、C/N、pH、转速和接种量作为影响因子, 以木质素降解率作为因变量, 通过单因素试验和正交试验确定响应面试验的中心点和关键影响因子, 然后用 BBD 试验确定最优降解条件, 在减少工作量的同时实现条件优化。最终, 本试验确定的最佳产酶条件为 pH 6.9、接种量 2.9%, C/N 29.0。与优化前相比, 菌株的 LiP、MnP 和 Lac 最大酶活性分别提升了 21.84%、27.67% 和 35.13%, 而且 4 d 后木质素降解率达到 (14.9±0.9)%, 比正交试验中的最大降解率高 2.0%。优化过程及结果对 LDB1 降解木质素的实际应用奠定了实验基础。

芽孢杆菌属是降解木质素的常见功能菌属, 广泛存在于畜禽粪便、农作物秸秆、污泥、园林废弃物等堆肥体系中^[17,33,38-41], 但目前关于芽孢杆菌降解硬木木质素的报道不多。本研究分析了菌株 LDB1 对柑橘枝的降解效果, 菌株 LDB1 能分泌 3 种木质素降解酶, 酶活最强的是 LiP [(175.62±27.09) U/mL], 高于多数已报道

的 LiP 酶活^[33]。酶的作用是启动一系列自由基链反应,形成高活性的中间体(如 $O\cdot$ 、 $H_2O\cdot$)氧化木质素,破坏木质素结构中的化学键^[42]。Lac 的作用在于氧化不同的芳香化合物(如酚类和一系列酚类衍生物),破坏芳香环中的碳碳键和 β -芳基键的稳定性^[43],Lip 可以氧化酚类和非酚类化合物,MnP 利用底物 Mn(II)、 H^+ 和 H_2O_2 生成 Mn(III)螯合物降解木质素的酚类部分^[44]。通过 FTIR 分析降解前后柑橘枝官能团的变化情况,我们发现木质纤维素结构中的 $C=O$ ($1\ 654\ cm^{-1}$)、芳香环骨架($1\ 596\ cm^{-1}$)、脂肪族甲基的 $C-H$ 和酚羟基的 $O-H$ ($1\ 374\ cm^{-1}$)、愈创木酚基结构和 $\beta-O-4$ ($1\ 270\ cm^{-1}$ 和 $854\ cm^{-1}$)等键位发生变化^[45-47]。由此可推断菌株 LDB1 主要破坏了柑橘枝木质素的芳香环结构,促进甲基或亚甲基 $C-H$ 键、 $C=O$ 键及愈创木基甲氧基 $C-O$ 等化学键断裂,使木质素解聚或结构重排。此外,SEM 中观察到柑橘枝形态结构的明显变化,可见菌株 LDB1 有效破坏了柑橘枝的理化结构。但本研究仅是室内降解试验,后续应通过室外堆肥进一步验证菌株 LDB1 对柑橘枝类高木质纤维素废弃物的降解效果,解析菌株降解木质素的产物和途径,为农林废弃物的高效利用提供菌种资源和依据。

4 结论

本研究从柑橘枝堆肥获得的解淀粉芽孢杆菌 LDB1 能够分泌 3 种木质素降解酶,并且能在 $50-60\ ^\circ C$ 的环境中生存。通过单因素试验、正交试验和响应面试验确定菌株 LDB1 降解木质素的最佳培养条件为温度 $38\ ^\circ C$ 、转速 $200\ r/min$ 、 $pH\ 6.9$ 、接种量 2.9% 和 $C/N\ 29.0$, 4 d 后菌株 LDB1 对碱木质素的降解率达到 14.9% 。在室内降解试验中,菌株 LDB1 对不同底物木质素均具有较强的降解能力,能够显著破坏木质纤维

素结构,促进木质纤维素降解。本研究为菌株 LDB1 的扩大培养和堆肥应用提供了理论指导和依据。

REFERENCES

- [1] ALIAÑO-GONZÁLEZ MJ, GABASTON J, ORTIZ-SOMOVILLA V, CANTOS-VILLAR E. Wood waste from fruit trees: biomolecules and their applications in agri-food industry[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(2): 238.
- [2] 刘春荣, 刘丽丽, 孙建城, 王登亮, 郑雪良, 吴雪珍, 陈骏, 程慧林. 果树废弃物资源化利用研究进展[J]. *东南园艺*, 2022, 10(1): 70-77.
- [3] LIU CR, LIU LL, SUN JC, WANG DL, ZHENG XL, WU XZ, CHEN J, CHENG HL. Research advances on the resource utilization of orchard waste[J]. *Southeast Horticulture*, 2022, 10(1): 70-77 (in Chinese).
- [4] RUBIN EM. Genomics of cellulosic biofuels[J]. *Nature*, 2008, 454: 841-845.
- [5] 李锋. 白蚁肠道降解木质素细菌资源挖掘及代谢过程与机制研究[D]. 镇江: 江苏大学博士学位论文, 2019.
- [6] LI F. Research on the symbiotic bacteria on lignin degradation from termite guts system and its metabolic mechanism[D]. Zhenjiang: Doctoral Dissertation of Jiangsu University, 2019 (in Chinese).
- [7] CHEN L, CHEN YN, LI YP, LIU YH, JIANG HJ, LI H, YUAN Y, CHEN YR, ZOU B. Improving the humification by additives during composting: a review[J]. *Waste Management*, 2023, 158: 93-106.
- [8] WU D, WEI ZM, MOHAMED TA, ZHENG GR, QU FT, WANG F, ZHAO Y, SONG CH. Lignocellulose biomass bioconversion during composting: mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives[J]. *Chemosphere*, 2022, 286(Pt 1): 131635.
- [9] HARINDINTWALI JD, ZHOU JL, YU XB. Lignocellulosic crop residue composting by cellulolytic nitrogen-fixing bacteria: a novel tool for environmental sustainability[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 715: 136912.
- [10] GREFF B, SZIGETI J, NAGY Á, LAKATOS E, VARGA L. Influence of microbial inoculants on co-composting of lignocellulosic crop residues with farm animal manure: a review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2022, 302(Pt B): 114088.
- [11] 李强, 吴晓青, 张新建. 微生物降解秸秆木质素的研究进展[J]. *微生物学报*, 2023, 63(11): 4118-4132.
- [12] LI Q, WU XQ, ZHANG XJ. Research progress in microbial degradation of straw lignin[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(11): 4118-4132 (in Chinese).
- [13] SURYADI H, JUDONO JJ, PUTRI MR, ECLESIAD AD, ULHAQ JM, AGUSTINA DN, SUMIATI T. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi[J]. *Heliyon*, 2022, 8(2): e08865.
- [14] 刘瑞, 张丽, 孙鹏, 徐刚, 曹颖, 胡尚连, 赵博. 微生物法降解木质素的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(7): 3232-3244.

- LIU R, ZHANG L, SUN P, XU G, CAO Y, HU SL, ZHAO B. Microbial degradation of lignin: a review[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(7): 3232-3244 (in Chinese).
- [12] WANG XL, YAO B, SU XY. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(11): 3373.
- [13] NIGUSSIE A, DUME BY, AHMED M, MAMUYE M, AMBAW G, BERHIUN G, BIRESAW A, ATICHO A. Effect of microbial inoculation on nutrient turnover and lignocellulose degradation during composting: a meta-analysis[J]. *Waste Management*, 2021, 125: 220-234.
- [14] 张鹏飞, 李素艳, 余克非, 姜新福. 木质素降解细菌的筛选及园林废弃物降解研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2018, 45(4): 676-681.
ZHANG PF, LI SY, YU KF, JIANG XF. Screening of lignin-degrading bacteria and study on degradation of garden waste[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2018, 45(4): 676-681 (in Chinese).
- [15] MEI JF, SHEN XB, GANG LP, XU HJ, WU FF, SHENG LQ. A novel lignin degradation bacteria-*Bacillus amyloliquefaciens* SL-7 used to degrade straw lignin efficiently[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 310: 123445.
- [16] 郭玲玲, 江志阳, 陶姝宇, 于森, 朱晓琳, 陈丽媛. 耐高温木质素降解菌筛选及降解效果研究[J]. *微生物学杂志*, 2022, 42(4): 64-69.
GUO LL, JIANG ZY, TAO SY, YU M, ZHU XL, CHEN LY. Screening and degradation effect of high temperature resistant lignin degradable bacteria[J]. *Journal of Microbiology*, 2022, 42(4): 64-69 (in Chinese).
- [17] 牛佳钰. 秸秆源木质纤维素在好氧堆肥化中的降解研究[D]. 无锡: 江南大学博士学位论文, 2022.
NIU JY. Degradation of lignocellulose from corn straw during aerobic composting[D]. Wuxi: Doctoral Dissertation of Jiangnan University, 2022 (in Chinese).
- [18] 谢长校, 孙建中, 李成林, 朱道辰. 细菌降解木质素的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(6): 1122-1132.
XIE CX, SUN JZ, LI CL, ZHU DC. Exploring the lignin degradation by bacteria[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(6): 1122-1132 (in Chinese).
- [19] SALVACHÚA D, WERNER AZ, PARDO I, MICHALSKA M, BLACK BA, DONOHOE BS, HAUGEN SJ, KATAHIRA R, NOTONIER S, RAMIREZ KJ, AMORE A, PURVINE SO, ZINK EM, ABRAHAM PE, GIANNONE RJ, POUDEL S, LAIBLE PD, HETTICH RL, BECKHAM GT. Outer membrane vesicles catabolize lignin-derived aromatic compounds in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(17): 9302-9310.
- [20] SHIN SK, KO YJ, HYEON JE, HAN SO. Studies of advanced lignin valorization based on various types of lignolytic enzymes and microbes[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289: 121728.
- [21] TAN FY, CHENG J, ZHANG Y, JIANG XF, LIU YQ. Genomics analysis and degradation characteristics of lignin by *Streptomyces thermocarboxydus* strain DF3-3[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 78.
- [22] 张亚茹, 任静, 张伟涛, 王树香, 王硕, 马非雨, 李术娜, 李红亚. 解淀粉芽胞杆菌 MN-13 的分离、鉴定及木质素降解特性[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(7): 1389-1399.
ZHANG YR, REN J, ZHANG WT, WANG SX, WANG S, MA FY, LI SN, LI HY. Screening, identification and lignin-degradation characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* MN-13[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(7): 1389-1399 (in Chinese).
- [23] NIU JY, LI XF, QI XG, REN YP. Pathway analysis of the biodegradation of lignin by *Brevibacillus thermoruber*[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125875.
- [24] 李彩联, 郭艳丽, 张铁鹰, 王丽华, 高爱琴. 高产漆酶菌株的筛选、鉴定和固态发酵条件优化[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(11): 6501-6509.
LI CL, GUO YL, ZHANG TY, WANG LH, GAO AQ. Screening, identification and optimization of solid-state fermentation conditions for high-yield laccase strain[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2021, 33(11): 6501-6509 (in Chinese).
- [25] 韩宇杰, 常潇, 向海, 高劲松, 钟荣珍. 秸秆木质素降解细菌的筛选及其降解条件优化[J]. *动物营养学报*, 2023, 35(7): 4740-4751.
HAN YJ, CHANG X, XIANG H, GAO JS, ZHONG RZ. Isolation of straw lignin-degrading bacteria and optimization of their degradation conditions[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2023, 35(7): 4740-4751 (in Chinese).
- [26] TIEN M, KIRK TK. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1984, 81(8): 2280-2284.
- [27] WARIISHI H, VALLI K, GOLD MH. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(33): 23688-23695.
- [28] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.
BUCHANAN RE, GIBBONS NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [29] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG XZ, CAI MY. *Handbook of Identification of Common Bacterial Systems*[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [30] van SOEST PJ, ROBERTSON JB, LEWIS BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J]. *Journal of Dairy Science*, 1991, 74(10): 3583-3597.
- [31] WU XY, AMANZE C, WANG JS, YU ZJ, SHEN L, WU XL, LI JK, YU RL, LIU YD, ZENG WM. Isolation and characterization of a novel thermotolerant alkali

- lignin-degrading bacterium *Aneurinibacillus* sp. LD3 and its application in food waste composting[J]. *Chemosphere*, 2022, 307(Pt 3): 135859.
- [32] CHANG YC, CHOI D, TAKAMIZAWA K, KIKUCHI S. Isolation of *Bacillus* sp. strains capable of decomposing alkali lignin and their application in combination with lactic acid bacteria for enhancing cellulase performance[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 152: 429-436.
- [33] 余克非. 园林绿化废弃物堆肥优势降解菌的筛选及复合菌剂配比研究[D]. 北京: 北京林业大学博士学位论文, 2020.
- YU KF. Isolation of lignocellulolytic microorganisms to develop a composite inoculum for green waste composting[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [34] 张芳芳, 张桐, 戴丹, 张振豪, 张波, 李玉. 高效木质素降解菌的筛选及其对玉米秸秆的降解效果[J]. *菌物学报*, 2021, 40(7): 1869-1880.
- ZHANG FF, ZHANG T, DAI D, ZHANG ZH, ZHANG B, LI Y. Screening of efficient lignin-degrading fungal strains and their degradation on cornstalk[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(7): 1869-1880 (in Chinese).
- [35] KIM JY, LEE HW, LEE SM, JAE J, PARK YK. Overview of the recent advances in lignocellulose liquefaction for producing biofuels, bio-based materials and chemicals[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 279: 373-384.
- [36] 汤永玉, 吴国星, 李冉, 杨燕通, 王思洁, 梁晨, 张曼, 高熹. 响应面法优化爪哇虫草菌的培养条件及其对斜纹夜蛾的毒力和保护酶活性影响[J]. *微生物学报*, 2023, 63(12): 4555-4573.
- TANG YY, WU GX, LI R, YANG YT, WANG SJ, LIANG C, ZHANG M, GAO X. Response surface methodology-based optimization of culture conditions of *Cordyceps javanica* with effects on virulence and protective enzyme activity of *Spodoptera litura*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(12): 4555-4573 (in Chinese).
- [37] 张晓菲, 倪晓菁, 张子仪, 彭博权, 周舒扬, 阮心依, 方幽文, 梁馨月, 周天逸, 王倩, 刘鹏. 响应面法优化黑曲霉固定化条件及其对土壤中溴氰菊酯的降解特性研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(12): 4574-4593.
- ZHANG XF, NI XJ, ZHANG ZY, PENG BQ, ZHOU SY, RUAN XY, FANG YW, LIANG XY, ZHOU TY, WANG Q, LIU P. Optimization of immobilization conditions of *Aspergillus niger* for degrading deltamethrin in soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(12): 4574-4593 (in Chinese).
- [38] WANG Z, WU WQ, CUI LC, LI X, KULYAR MFEA, XIONG HQ, ZHOU N, YIN HH, LI JK, LI X. Isolation, characterization, and interaction of lignin-degrading bacteria from rumen of buffalo (*Bubalus bubalis*)[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(8): 757-768.
- [39] WANG J, LI ZJ, LIU F, HAN KF, MA QX, WU LH. Membrane-covered systems improve compost quality and alter microbial communities during composting with microbial inoculation[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2024, 447: 141501.
- [40] GUO YX, CHEN QJ, QIN Y, YANG YR, YANG QZ, WANG YX, CHENG ZA, CAO N, ZHANG GQ. Succession of the microbial communities and function prediction during short-term peach sawdust-based composting[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 332: 125079.
- [41] WANG LY, WANG TF, XING ZJ, ZHANG QF, NIU XH, YU YS, TENG ZJ, CHEN JX. Enhanced lignocellulose degradation and composts fertility of cattle manure and wheat straw composting by *Bacillus* inoculation[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2023, 11(3): 109940.
- [42] BUGG TDH, AHMAD M, HARDIMAN EM, RAHMANPOUR R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi[J]. *Natural Product Reports*, 2011, 28(12): 1883-1896.
- [43] MUNK L, ANDERSEN ML, MEYER AS. Direct rate assessment of laccase catalysed radical formation in lignin by electron paramagnetic resonance spectroscopy[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2017, 106: 88-96.
- [44] PAUL M, PANDEY NK, BANERJEE A, SHROTI GK, TOMER P, GAZARA RK, THATOI H, BHASKAR T, HAZRA S, GHOSH D. An insight into omics analysis and metabolic pathway engineering of lignin-degrading enzymes for enhanced lignin valorization[J]. *Bioresource Technology*, 2023, 379: 129045.
- [45] JAHAN MS, NASIMA CHOWDHURY DA, KHALIDUL ISLAM M, IQBAL MOEIZ SM. Characterization of lignin isolated from some nonwood available in Bangladesh[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(2): 465-469.
- [46] ZHAO J, WANG XW, HU J, LIU Q, SHEN DK, XIAO R. Thermal degradation of softwood lignin and hardwood lignin by TG-FTIR and Py-GC/MS[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2014, 108: 133-138.
- [47] WANG SR, WANG KG, LIU Q, GU YL, LUO ZY, CEN KF, FRANSSON T. Comparison of the pyrolysis behavior of lignins from different tree species[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(5): 562-567.